[1]以番茄斑萎病毒核蛋白为靶点的荧光偏振药物筛选体系的建立及应用*

王景丽[1**] 丁真真[3**] 刘辉[1] 唐延婷[2***]
（1 南开大学药学院，天津 300071　2 天津国际生物医药联合研究院，天津 300457
3 丹娜（天津）生物科技有限公司，天津 300467）

摘要：目的：基于荧光偏振技术建立靶向番茄斑萎病毒（Tomato spotted wilt virus，TSWV）核蛋白（NP）与核酸相互作用的药物筛选体系，并应用该体系展开药物筛选。**方法：**将目的基因克隆到 pGEX-6p-1 表达载体上，并采用大肠杆菌表达系统进行目的蛋白的异源表达。建立靶向 TSWV NP 与核酸相互作用的荧光偏振药物筛选体系，对体系的结合时间、DMSO 耐受、变异性和稳定性进行研究，并展开药物筛选。**结果：**成功构建重组质粒 pGEX-6p-1-NP，在大肠杆菌中表达并分离纯化出高质量的核蛋白。基于荧光偏振技术建立了信噪比为 8:1，Z 因子为 0.82 的稳定的靶向 TSWV NP 与核酸相互作用的药物筛选体系，并对化合物库中 1000 种化合物展开药物筛选，经过初步筛选获得了 1 种 IC_{50} 为 4.146 μmol/L 的化合物。**结论：**建立了稳定的荧光偏振筛选体系，适用于靶向 NP 与核酸相互作用的药物的筛选。筛选到的化合物为番茄斑萎病毒的预防和控制提供参考。
关键字：番茄斑萎病毒　核蛋白　荧光偏振　药物筛选

番茄斑萎病毒是一种重要的农作物病原体，1915 年在澳大利亚首次分离。该病毒通过昆虫（蓟马）传播，具有广泛的宿主（>1000 种宿主，包括单子叶植物和双子叶植物），危害蔬菜、花卉及多种粮食（如番茄，马铃薯，莴苣，胡椒，仙客来和凤仙花）等经济作物，是近年来 10 种最重要的植物病毒之一。

番茄斑萎病毒属于布尼亚病毒科番茄斑萎病毒属，布尼亚病毒科是一个庞大的负链 RNA 病毒家族，至今已发现 350 种血清学不同的病毒，包括 5 个属，分别为正布尼亚病毒属，汉塔病毒属，内罗病毒属，白蛉病毒属和番茄斑萎病毒属，除了番茄斑萎病毒属为植物病毒外，其他都是动物病毒，可以感染人或者家畜。与所有布尼亚病毒科病毒相似，TSWV 病毒基因组由 S、M、L 三个分段的单链 RNA 组成，小（S）RNA 片段编码核衣壳（N）蛋白和沉默抑制子 NSs 蛋白；中（M）RNA 片段编码两个表面糖蛋白（G_n 和 G_c）和运输蛋白（NSm）；大（L）RNA 片段编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RdRp，L 蛋白）。NP、RdRp 与基因组 RNA 结合形成病毒核糖核蛋白复合物（vRNP），作为 vRNA 复制和 mRNA 转录的功能模板。另外，TSWV NP 还可以与糖蛋白 G_n 和 G_c 相互作用，参与病毒粒子的形成；与 NSm 相互作用参与细胞间的运动，在病毒基因组 RNA 向邻近细胞扩散中起作用[1]。因此，TSWV NP 是一种多功能蛋白，在 TSWV 生命周期的不同阶段发挥生物学功能。2017 年 Komoda, K.[2]和南开大学郭宇[3]课题组先后解析了 TSWV NP 结构，Komoda,K. 首次报道了 TWSV NP 与寡聚核苷酸 25-poly-dT-nucleotide 复合物晶体，作为番茄斑萎病毒属中首个被解析的 NP，结构显示 NP 由 N 端，C 端和核心区组成，亚基之间相互作用形成不对称的环状三

---

* 天津市科技计划（14ZCZDSY00046 和 13ZCZDSY03800）资助项目
** 共同第一作者
*** 通讯作者，电子邮箱：titihere@163.com

聚体，与布尼亚病毒科的其他病毒的核蛋白 NP 相似，环内正电荷的空腔，可与 RNA 结合，在基因组衣壳化中发挥重要作用。

干扰 NP 与寡聚核苷酸结合的化合物有望用于防治番茄斑萎病毒，降低农作物的损失。蛋白与核酸相互作用的检测手段有多种，如凝胶阻滞实验（EMSA）、DNase Ⅰ足迹分析、AlphaScreen、荧光偏振分析、等温量热滴定法（ITC）、表面等离子共振（SPR）等，其中 EMSA、DNase Ⅰ足迹法、ITC 和 SPR 步骤繁琐；AlphaScreen 需要标记蛋白、抗体以及供、受体珠[4]，检测成本高。而荧光偏振应用于荧光分子以及荧光分子与其他分子之间的相互作用由来已久[5]，只需标记分子量小的配体，反应均相，无需洗涤操作，易于自动化，适于快速的筛选检测；检测限更低，可达亚纳摩尔级范围，可以实时监测（动力学检测）[6-9]；荧光标记的探针均一性好，性质稳定，可长期保存，方法的重现性好；荧光偏振是一个比值，与其他荧光检测技术相比，不易受溶液颜色和仪器灵敏度变化的影响，实验结果稳定，可靠性高。因此，荧光偏振分析成为优先选择的分析方法。

目前并没有防治番茄斑萎病毒的特效药，只有少数几个商品化药物用于防治植物病毒病，如宁南霉素、病毒唑、大黄素甲醚、盐酸吗啉胍（病毒灵）、氯溴异氰尿酸、壳寡糖、DHT（2,4-二氧代六氢-1,3,5-三嗪）、DADHT（二乙酰均三嗪-2，4-二酮）等，虽然对番茄斑萎病毒有一定的防治效果，但并非基于番茄斑萎病毒开发的药物。NP 作为防治番茄斑萎病毒药物的分子靶标，具有重要的药物研发价值。本研究以 NP 为靶标，在寡聚核苷酸分子的 5’端连接上荧光基团 FITC，用荧光偏振来检测蛋白与核酸的相互作用，以期筛选出干扰两者相互作用的化合物。

1. 材料与方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 材料

E. coli DH5α菌株、BL21(DE3) 菌株、表达载体 pGEX-6p-1 均为本实验室保存。 TSWV NP 基因由北京奥科鼎盛生物技术有限公司合成；FITC 标记寡聚核苷酸 FITC-25T 和寡聚核苷酸 25T 分别由天津为科生物技术有限公司和通用生物系统有限公司合成。分子实验试剂均购于 Thermo Fisher 公司；蛋白表达纯化所用试剂购自生工生物(上海)股份有限公司；384 孔黑色底透微孔板购自 Thermo Fisher 公司。

1.1.2 仪器

JN-3000 Plus 型超高压连续流细胞破碎机，购自广州聚能生物科技有限公司；蛋白纯化层析系统（AKTA FPLC）及层析柱购于 GE 公司；Spark 10M 多功能酶标仪购于 Tecan 公司。

1.2 方法

1.2.1 核蛋白纯化相关缓冲液

破菌缓冲液：20 mmol/L HEPES，pH7.0，500 mmol/L NaCl，5 mmol/L DTT；离子交换层析（Heparin）缓冲液 A：20 mmol/L HEPES，pH7.0，40 mmol/L NaCl，5 mmol/L DTT；缓冲液 B：20 mmol/L HEPES，pH7.0，1mol/L NaCl，5 mmol/L DTT；凝胶过滤层析（Superdex 200）缓冲液：20 mmol/L HEPES，pH7.0，200 mmol/L NaCl，5 mmol/L DTT。

1.2.2 TSWV NP 的表达及纯化

将 TSWV NP 全长基因 1-777bp（GenBank: AB889601.1）构建到 pGEX-6p-1 载体上，重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)中，挑取单克隆在 LB 培养基中 37℃

扩大培养至 OD_{600} 为 0.6~0.7，加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG，16℃诱导 16h。4℃ 4500 rpm 离心 15min 收集菌体，用破菌缓冲液重悬、破碎、12000rpm 离心，取上清。上清液进行 GSH 亲和层析，用 Prescission Protease 4℃过夜切去 GST 标签，然后经离子交换和 Superdex 200 凝胶过滤层析进一步纯化得到纯度较高的目的蛋白，经 NanoDrop 2000 测定浓度后分装置-80℃保存。

1.3 荧光偏振药物筛选模型的建立及应用

1.3.1 荧光偏振药物筛选模型的建立与评价

荧光基团 FITC 标记的 25T（图 1）经垂直偏振光激发（485nm），25T 分子小（~7500Da），在溶液中转动速度较快，发射光（535nm）将去偏振化；当 25T 与 NP 蛋白结合，形成蛋白核酸复合物，转动速度慢，发射光将保持偏振性[10-11]。通过测定偏振值（P 或 mP）的大小来检测 DNA 与核蛋白的结合程度，进一步对探针浓度、蛋白浓度、DMSO 浓度和孵育时间进行优化，最后采用 Z 因子对反应体系的稳定性进行评价。

$$mP = \left[\frac{(S - P*G)}{S + P*G}\right] x1000$$

公式 1 毫偏的计算公式

Equation1 Calculation of the fluorescence polarization. (S is the intensity of emitted light polarized parallel to the excitation light, and P is the the intensity of emitted light polarized perpendicular to the excitation light. G is a correction factor.)



图 1 FITC 标记的探针 25T

Fig.1 FITC labeled 25T

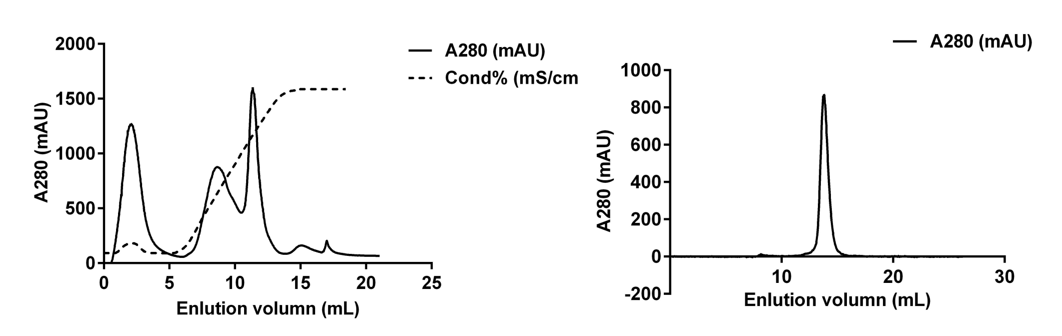
1.3.2 药物筛选

利用建立的筛选体系进行药物筛选，在 384 孔板中加入 18 μL 2.5 μmol/L NP，然后加入 1 μL 2.5 μmol/L 的荧光探针，最后加入 1 μL 化合物，室温孵育 30min，设定阳性对照（mP_o）为不加蛋白孔，阴性对照（mP_{neg}）为不加化合物孔。化合物的抑制率为：1-（mP_i-mP_0）/（mP_{neg}-mP_0），其中 mP_i 为加入化合物后的偏振值。

2. 结果

2.1 TSWV NP 的表达及纯化

NP 依次经 GSH 亲和层析、离子交换层析（图 2a）和 Superdex-200 凝胶过滤层析（图 2b）后，12% SDS-PAGE（图 2c）显示~28kDa 处得到纯度较高的目的蛋白。将蛋白浓缩至 40 mg/mL，于-80℃保存。



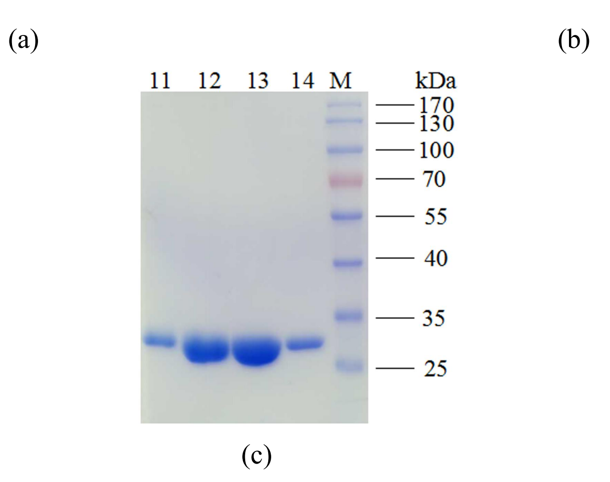


图 2　NP 层析及 12% SDS-PAGE 结果

(a) 离子交换层析结果；(b) 凝胶过滤层析结果；(c) 12% SDS-PAGE 检测

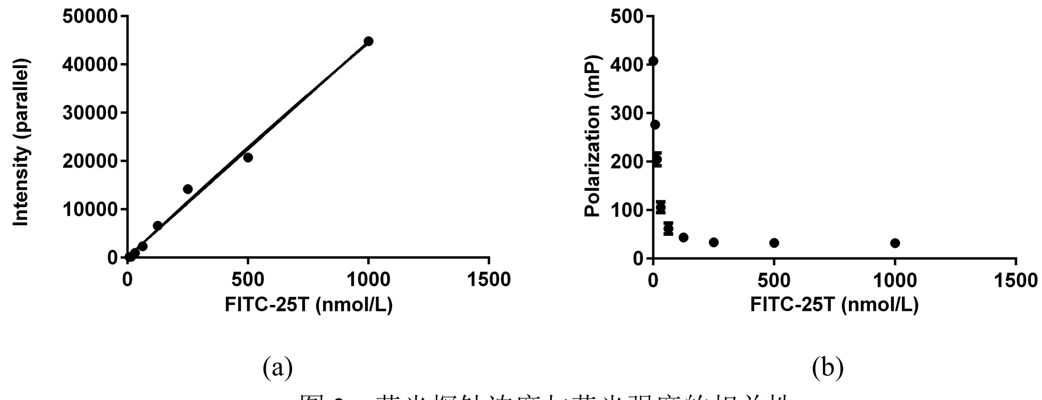
Fig.2　The recombinant NP was analyzed by chromatogram and 12% SDS-PAGE.

(a) Ion exchange chromatogram; (b) Size exclusion chromatogram; (c) 12% SDS-PAGE

2.2 荧光偏振药物筛选模型的建立与评价

2.2.1 探针浓度的确定

在黑色 384 孔板中，反应体系为 20 μL，用蛋白缓冲液梯度稀释荧光探针，设定探针浓度为 0 的孔作为空白对照。用 Spark 10M 多功能酶标仪在 FP 模式下测量荧光探针平行偏振光强度，观察探针浓度与平行偏振光强度的线性关系。另外，不同浓度的荧光探针在蛋白缓冲液中的偏振值理论上基本一致。如图 3a 所示，探针的平行偏振光强度与浓度在较宽的范围内呈现较好的线性关系。图 3b 随着探针浓度的降低，偏振值明显升高波动较大，在偏振值波动较小的范围内选择最佳探针浓度为 125 nmol/L。



(a)　　　　(b)

图 3　荧光探针浓度与荧光强度的相关性

(a) 平行偏振光强度与探针浓度线性相关性分析（R^2 0.9921）(b) 不同探针浓度的偏振值

Fig.3　The relativity analysis between probe concentration and fluorescence intensity

(a) The linear regression analysis between parallel polarized light intensity and probe concentration (R^2 0.9921) (b) Polarization values at various probe concentrations

表 1 不同探针浓度下的荧光强度和偏振值的平均值

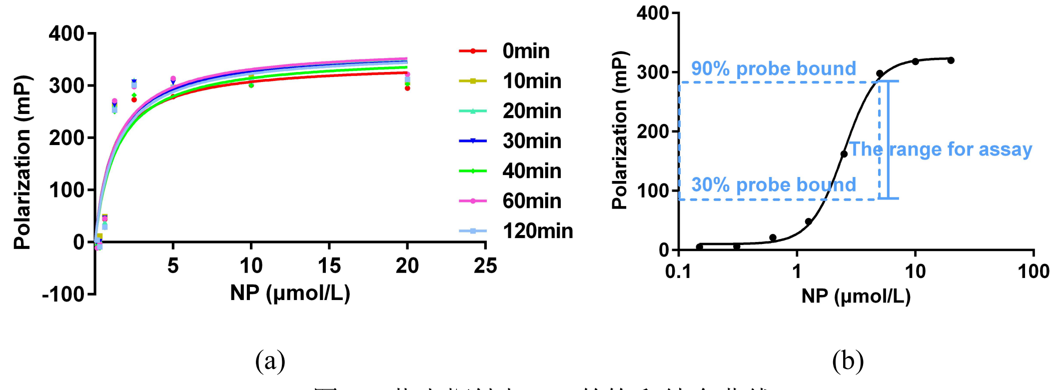
Table 1　The average value of fluorescence intensity and polarization values at various probe concentrations

Probe (nmol/L)	1000	500	250	125	62.5	31	15.5	7.7	0

Parallel intensity	45400	21327	14785	7203	2961	1569	772	756	590
mP	32.00	32.33	33.67	43.67	62.00	105.67	204.67	276.33	407.67

2.2.2 蛋白浓度和孵育时间的确定

采用饱和曲线法，测定探针和蛋白相互作用的解离平衡常数 K_d。选定探针浓度为 125 nmol/L，蛋白浓度从 20~0.075 μmol/L，25℃孵育不同的时间检测偏振值。如图 4 所示，25℃孵育 10 min，蛋白与探针结合达到平衡，K_d 为 1.23 μmol/L，最大偏振值为 mP_{max} 365.40。在线性范围内（30~90% mP_{max}）选择最佳蛋白浓度为 2.5 μmol/L。



(a) (b)

图 4　荧光探针与 NP 的饱和结合曲线

(a) 偏振值随蛋白浓度的增加而升高；(b) 偏振值随蛋白浓度（对数值）的增加而呈 S 型变化

Fig.4　Saturation binding curve of the labeled 25T to NP.

(a) The polarization value increases with increasing protein concentration; (b) The polarization value changes with the increase of protein concentration (logarithmic value).

表 3　不同孵育时间下的 K_d 值

Table 3　K_d values at different incubation times

Time/min	0	10	20	30	40	60	120
K_d (μmol/L)	1.22	1.23	1.28	1.26	1.42	1.32	1.39

2.2.3 竞争曲线和孵育时间的确定

确定了体系探针和蛋白的浓度分别为 2.5 μmol/L 和 125 nmol/L，为了进一步测定探针与蛋白结合的特异性，用未标记的寡聚核苷酸 25T 和荧光探针竞争结合 NP[12-13]。NP 2.5 μmol/L 与探针 125 nmol/L，25℃孵育 10 min，然后向各孔中加入不同浓度的寡聚核苷酸 25T，25℃孵育不同的时间，测定偏振值。如图 5 所示，加入寡聚核苷酸后，随着孵育时间延长，IC_{50} 值逐渐减小，30 min 后趋于稳定。

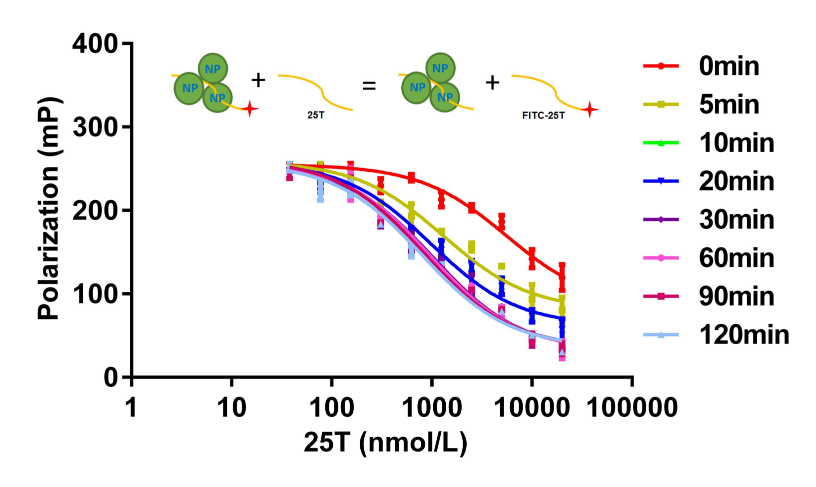


图 5　竞争结合曲线

Fig.5　Competitive binding curve by titration with the unlabeled probe 25T at different incubation times, keeping the labeled probe and NP concentration constant.

表 4　孵育不同时间的 IC_{50} 值

Table 4　IC_{50} values at different incubation times

Time/min	0	5	10	20	30	60	90	120
IC_{50} (μmol/L)	5.61	1.31	0.98	0.98	1.03	0.97	0.84	0.80

2.2.4 DMSO 的耐受

在药物筛选中，DMSO 是主要的药物溶剂，因此需要评价筛选体系对 DMSO 的耐受程度。向反应体系中加入不同体积分数的 DMSO（0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%），25℃孵育 10 min，检测偏振值；固定荧光探针浓度 125 nmol/L，蛋白浓度从 20 μmol/L 稀释至 0.15 μmol/L。加入不同体积分数的 DMSO（0、1%、5%、10%），25℃孵育 10 min，检测偏振值。通过 DMSO 对 mP 以及饱和曲线的影响，判断结合体系对 DMSO 的耐受程度。如图 6 所示，当 DMSO 含量在 10%以内时，对体系的 mP 和 K_d 值没有影响。

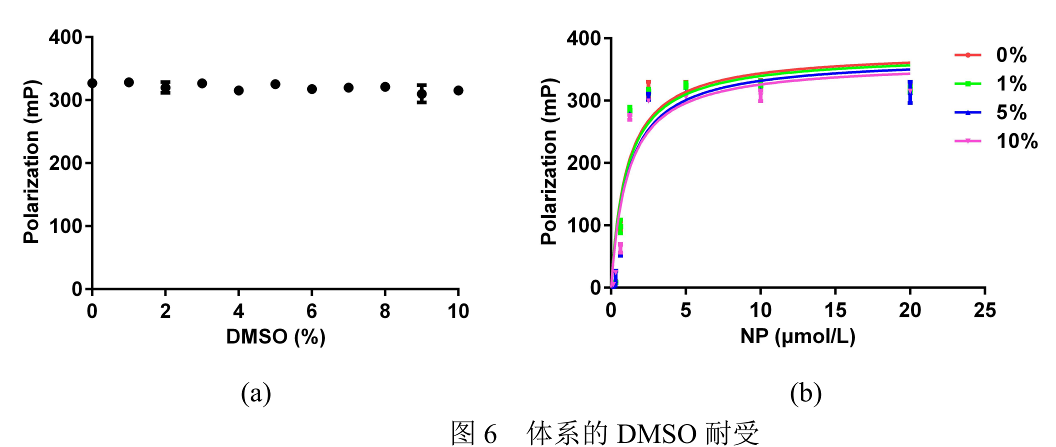


图 6　体系的 DMSO 耐受

(a) DMSO 对偏振值的影响；　(b) DMSO 对结合曲线的影响

Fig.6　DMSO tolerance of the assay

(a) Effect of DMSO on the Polarization values ; (b) Effect of DMSO on the K_d

表 5 不同 DMSO 浓度下的偏振值和 K_d 值

Table 5 Polarization values and K_d values at vatious DMSO concentrations

DMSO%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mP	327.00	328.33	320.00	326.67	315.33	325.33	317.67	320.00	321.33	310.00	315.33
K_d	1.04	1.06	ND[1)]	ND	ND	1.15	ND	ND	ND	ND	1.12

1) = Not done.

2.2.5 体系的稳定性评价

经过以上优化实验，确定了最终的筛选体系，如表 6 所示。Z-因子是评价药物筛选体系稳定性的重要指标，当 Z 因子 ＞0.5，体系比较稳定，可用于药物筛选[14]。在 384 孔板的左、中、右三部分，分别设定阴性及阳性对照组各 30 个孔，阴性对照组（mP_{neg}）为不加化合物的孔，阳性对照组（游离探针的背景值 mP_{pos} 或 mP_0）为不加蛋白的孔，连续测定 3 天，计算 Z 因子。各孔偏振值如图 7 所示，阴性对照 mP 的平均值为 327.33，变异系数 CV 为 2.9%（<10%）；阳性对照的平均值为 39.65，变异系数 CV 为 17.7%（< 20%）；体系的信噪比为 8:1，信号窗口足够大；Z 因子为 0.82 > 0.5，显示该体系可用于药物筛选。

表 6 筛选体系的各组分

Table 6 The components of the FP Assay

加样顺序	组分	浓度/μmol/L	体积/μL
1	NP	2.5	18
2	荧光探针	0.25	1
3	化合物	50	1
总体积 20 μL			

$$Z = 1 - \frac{(3\sigma_{pos} + 3\sigma_{neg})}{|\mu_{pos} - \mu_{neg}|}$$

公式 2 Z-因子计算公式（σ和μ分别表示阴、阳对照的标准偏差和平均值）

Equation 2 Calculation of Z-factor. μ_{pos} *and* μ_{neg} are denoted for the means of the positive control signal and the negative control signal, and the standard deviations (SDs) of the signals are denoted as σ_{pos} and σ_{neg} , respectively

$$S / B = signal / background$$

公式 3 信噪比

Equation 3 The signal-to-background ratio(S/B)

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \times 100\%$$

公式 4 变异系数（σ和μ分别表示标准偏差和平均值）

Equation 4 Coefficient of variation (σ and μ represent standard deviation and average, respectively)

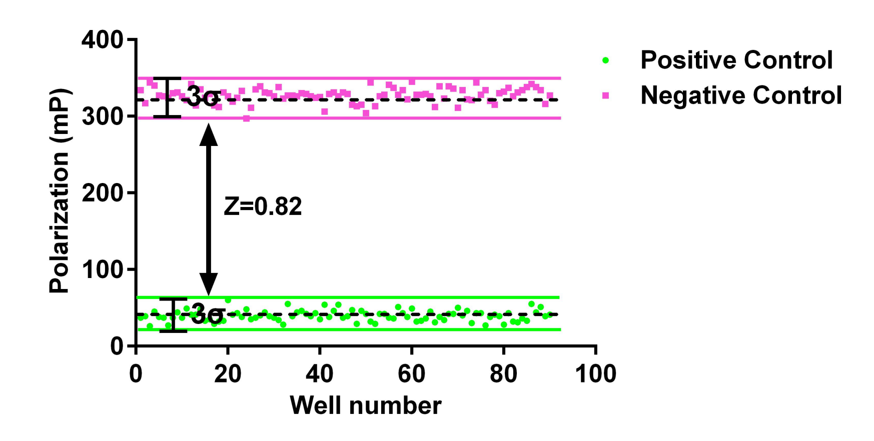


图 7　阴性对照组和阳性对照组的偏振值

Fig.7　Calculation of Z factor to monitor assay performance, by polarization values of the negative control group and the positive control group

2.3 NP 抑制剂筛选结果

应用建立的药物筛选体系对药物库中的 1000 种化合物进行筛选，其中 1 种化合物在 100 μmol/L 时抑制率为 90.95%，进一步测得其 IC_{50} 为 4.146 μmol/L。

3.　讨论

12% SDS-PAGE 检测显示 NP 分子量正确，且纯度很高，可以用于后续药物筛选体系的建立及筛选。构建药物筛选体系时选择的荧光探针浓度的原则是其平行偏振光的强度在线性范围内，且至少是空白对照的 10 倍[15]，荧光探针的偏振值波动要小，所以选择 125 nmol/L。竞争曲线测得的 IC_{50} 值（0.8~1 μmol/L）与饱和曲线得到的 K_d 大小相近[16]，一方面表明 NP 与寡聚核酸的亲和力较好，另一方面说明荧光标记对寡聚核苷酸与 NP 的结合基本没有干扰。竞争实验孵育时间至少为 30 min，使蛋白与寡聚核酸的结合达到平衡。DMSO 耐受实验显示当 DMSO 含量在 10%以内时，对体系的 mP 和 K_d 值没有影响，体系对 DMSO 耐受性较好，化合物的溶剂对该体系没有干扰。基于荧光偏振技术建立的药物筛选体系，阴性对照变异系数 CV 为 2.9% （< 10%），阳性对照变异系数 CV 为 17.7%（< 20%）；信噪比为 8:1；Z 因子为 0.82 > 0.5，显示体系稳定性好，适用于高通量药物筛选。本文运用该筛选体系对化合物库展开药物筛选，经初筛发现 1 种化合物在 100 μmol/L 时抑制率达到 90%以上，复筛测得 IC_{50} 为 4.146 μmol/L。

4.　结论

本实验采用大肠杆菌异源表达系统制备了高质量的 TSWV NP，并建立了基于荧光偏振技术的药物筛选体系，该体系均相、无放射性标记，步骤简单，易于操作，能应用于大规模的药物筛选，筛选出了 1 种 IC_{50} 为 4.146 μmol/L 的化合物，为后续的药物设计与开发提供思路，也为番茄斑萎病害的预防和控制提供参考。另外，布尼亚病毒科的病毒 NP 结构相似，与基因组相互作用介导病毒基因组的衣壳化，该荧光偏振药物筛选体系为干扰 NP 与基因组组装的药物研究提供了筛选模型。

参考文献

[1] Li J, Feng Z, Wu J, et al. Structure and function analysis of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt virus interacting with RNA using homology modeling. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(7): 3950-61. doi: 10.1074/jbc.M114.604678. PMID: 25540203.

[2] Komoda K, Narita M, Yamashita K, et al. The asymmetric trimeric ring structure of the nucleocapsid protein of Tospovirus. Journal of Virology, 2017, 91(20). pii: e01002-17. doi: 10.1128/JVI.01002-17. PMID:28768868.
[3] Guo Y, Liu B, Ding Z, et al. Distinct Mechanism for the Formation of the Ribonucleoprotein Complex of Tomato Spotted Wilt Virus. Journal of Virology. 2017, 91(23). pii: e00892-17. doi: 10.1128/JVI.00892-17. PMID: 28904194.
[4] Wilson J, Rossi CP, Carboni S, et al. A homogeneous 384-well high-throughput binding assay for a TNF receptor using alphascreen technology. Journal of Biomolecular Screening, 2003, 8(5): 522-532. DOI: 10.1177/1087057103257804. PMID: 14567779.
[5] Checovich WJ, Bolger RE, Burke T, et al. Fluorescence polarization: a new tool for cell and molecular biology. Nature, 1995, 375(6528): 254-256. DOI:10.1038/375254a0. PMID: 7746330.
[6] Kakehi K, Oda Y, Kinoshita M, et al. Fluorescence polarization: analysis of carbohydrate-protein interactions. Analytical Biochemistry, 2001, 297(2): 111-116. DOI: 10.1006/abio.2001.5309. PMID: 11673876.
[7] Moerke NJ. Fluorescence Polarization (FP) Assays for Monitoring Peptide-Protein or Nucleic Acid–Protein Binding. Current Protocols in Chemical Biology, 2009, 1(1):1-15. DOI: 10.1002/9780470559277.ch090102. PMID: 23839960.
[8] Terpetschnig E, Szmacinski H, Lakowicz JR, et al. Long-lifetime metal-ligand complexes as probes in biophysics and clinical chemistry. Methods in Enzymology, 1997, 278(278): 295-321. PMID: 9170319.
[9] Burke TJ, Loniello KR, Beebe JA, et al. Development and application of fluorescence polarization assays in drug discovery. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2003, 6(3): 183–194. PMID: 12678697.
[10] Jameson DM, Sawyer WH. Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions. Methods in Enzymology, 1995, 246(28): 283-300. PMID: 7752928.
[11] Hill JJ, Royer CA. Fluorescence approaches to study of protein-nucleic acid complexation. Methods in Enzymology, 1997, 278(97): 390-416. PMID: 9170324.
[12] Roehrl MH, Wang JY, Wagner G, et al. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization. Biochemistry, 2004, 28;43(51):16056-66. DOI: 10.1021/bi048233g. PMID: 15610000.
[13] Roehrl MH, Wang JY, Wagner G, et al. Discovery of Small-Molecule Inhibitors of the NFAT-Calcineurin Interaction by Competitive High-Throughput Fluorescence Polarization Screening. Biochemistry, 2004, 43(51): 16067–16075. PMID: 15610001.
[14] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg K R, et al. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. Journal of Biomolecular Screening, 1999, 4(2): 67-73. DOI: 10.1177/108705719900400206. PMID: 10838414.
[15] Arkin MR, Glicksman MA, Fu H, et al. Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats. PubMed , 2012. PMID: 22553871.
[16] Munson PJ, Rodbard D. An exact correction to the Cheng-Prusoff correction. Journal of Receptor Research, 1988, 8(1-4): 533-546. PMID: 3385692.

2 Development and Application of the Binding Assay for Tomato Spotted Wilt Virus Nucleoprotein Using Fluorescent Polarization Technology*

WANG Jing-li [1**] DING Zhen-zhen [3**] LIU Hui [1] TANG Yan-ting [2***]

(1 College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2 Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China)

(3 Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300467, China)

Abstract

Objective: Based on fluorescence polarization technology, a binding assay targeting the interaction between tomato spotted wilt virus (TSWV) nucleoprotein (NP) and nucleic acid was established and used for drug screening. **Methods**: The full-length NP DNA amplicon was cloned into the pGEX-6p-1 expression vector, and the construct pGEX-6p-1-NP was transformed into *E. coli* strain BL(DE3). Recombinant NP protein was purified with a general protocol. A fluorescence polarization assay that is sensitive to inhibitors disrupting TSWV NP/nucleic acid interactions was established. The assay's DMSO tolerance, incubation time, stability and variability were studied and a pilot drug screening was performed. **Results**: The recombinant plasmid pGEX-6p-1-NP was successfully constructed and the high quality recombinant NP was purified. A 384-well fluorescence polarization assay targeting TSWV NP and nucleic acid interaction was developed and validated, with a signal-to-noise ratio of 8:1 and a Z factor of 0.82 was obtained, demonstrating the assay is HTS compatible. This assay was used to screen 1000 compounds in the chemical libraries. After the primary screening, one compound with IC_{50} of 4.146 μmol/L was identified. **Conclusion**: The fluorescence polarization assay is stable and suitable for the screening inhibitors blocking the interaction between NP and nucleic acids, and the compound provides a reference for the prevention and control of TSWV.

Keywords:

Tomato spotted wilt virus; Nucleoprotein; Fluorescence polarization; Drug screening

---

* This work was supported by the Tianjin Science and Technology Program (14ZCZDSY00046) and (13ZCZDSY03800).

** W. J. and D.Z. contributed equally to this work.

*** Corresponding Author, E-mail: titihere@163.com